

ВІДЗИВ

офіційного опонента

на дисертаційну роботу **Мазур Ю. Ю.** "Калікс[4]арен С-90 як селективний інгібітор Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани клітин міометрія",

представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 - біохімія

Система підтримання внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу відіграє важливу роль у регуляції метаболічних процесів, забезпечуючи функціонування іонів Са як вторинних посередників. Особливого значення ця система набуває у клітинах гладеньких м'язів матки, оскільки є залученою до регуляції скорочувальної активності цього органу, а отже, до його адекватного функціонування у разі вагітності та пологів. Тому розробка підходів до регуляції контрактильної функції гладенького м'яза матки через створення нових фармакологічних сполук, здатних нормалізувати скорочувальну функцію матки у випадку її порушень, є важливим науковим завданням.

Серед мембранних протеїнів, безпосередньо задіяних до контролювання Ca^{2+} гомеостазу (кальцієві канали, помпи, обмінники та уніпортери) Mg^{2+} , АТР-залежна Ca^{2+} -помпа плазматичної мембрани (ПМ) відіграє ключову роль у виведенні іонів Са з клітини, необхідному для розслаблення міометрія. Каталітичну та транспортну активність кальцієвої помпи всебічно досліджено на препаратах плазматичної мембрани, але сучасний рівень досліджень потребує глибшого з'ясування її фізіологічної ролі на рівні цілої клітини, а також підходів до контрольованого впливу на її активність. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є дослідження наслідків специфічного пригнічення Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани. Проте, на відміну від Mg^{2+} , АТР-залежної Ca^{2+} -помпи саркоплазматичного ретикулула, Na^+, K^+ -АТРази та Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій, для яких відомі специфічні інгібітори (тапсигаргін, оуабаїн, рутенієвий червоний відповідно), афінний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани дотепер не відомий. Пошук такого модулятора серед представників сімейства каліксаренів є виправданим, оскільки особливості будови цих біологічно активних макроциклічних олігомерів фенолів дозволяють контрольовано модифікувати їх структуру шляхом введення різноманітних замісників у різні положення. Вказане і зумовлює актуальність представленої дисертаційної роботи.

У літературному огляді автор детально характеризує особливості будови, властивості та шляхи регуляції активності Ca^{2+} - помпи плазматичної мембрани, описує структуру, хімічні властивості та біологічну активність каліксаренів. У списку літературних джерел достатньо повно представлено експериментальні роботи останніх років. Зміст автореферату відповідає основним положенням дисертаційної роботи.

Свідченням достовірності отриманих у роботі даних та обґрунтованості зроблених висновків є широкий спектр використаних сучасних методичних прийомів. Це методи препаративної біохімії, ензимології та мембранології (отримання фракції плазматичних мембран, спектрофотометричне визначення активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази, створення рівноважного потенціала Гіббса-Доннана); спектрофлуорометричні (з використанням зондів fluo-4, DiOC₆, АНС); лазерної конфокальної мікроскопії; тензометрії; кінетичного аналізу та математичного моделювання.

У роботі отримано низку даних, які є свідченням її новизни. З використанням препарату плазматичних мембран міоцитів встановлено, що калікс[4]арен С-90 дозозалежно з достатньо високою афінністю ($I_{50} = 20\text{мкМ}$) та ефективністю пригнічує каталітичну активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази, не впливаючи на активність інших АТР-гідролаз ПМ. У результаті детального кінетичного аналізу з'ясовано, що у діапазоні до 50мкМ калікс[4]арен С-90 діє як повний неконкурентний інгібітор Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ. З використанням зонду АНС доведено мембранотропні ефекти 100мкМ калікс[4]арена С-90. Важливо, що у роботі вивчено вплив калікс[4]арена С-90 не лише на каталітичну, але й на транспортну активність Ca^{2+} - помпи ПМ. Показано, що з використанням кальцієвого зонду fluo-4 можна оцінити акумуляцію Ca^{2+} у замкнених inside-out везикулах плазматичної мембрани та продемонстровано пригнічувальну дію 100мкМ калікс[4]арена С-90 на цей показник.

У порівняльному дослідженні дії 8-х каліксаренів різної будови встановлено, що виявлений інгібіторний ефект калікс[4]арена С-90 зумовлений наявністю чотирьох сульфанілімінових груп на верхньому кінці каліксаренової чаші. Показано, що введення ліпофільних залишків у нижній вінець чаші (калікс[4]арен С-956) дозволяє дещо підвищити спорідненість інгібітора до ензима, що вказує на можливі шляхи подальшої модифікації структури інгібітора з метою посилення його ефективності.

В експериментах з пермеабілізованими міоцитами показано, що калікс[4]арен С-90 пригнічує також Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність саркоплазматичного ретикулума, проте з дещо нижчою ефективністю, ніж відповідну активність ПМ.

Результати, отримані у модельних експериментах з використанням везикул плазматичної мембрани та пермеабілізованих дигітоніном клітинах підтверджено методом конфокальної мікроскопії інтактних клітин. Показано, що 20мкМ калікс[4]арен С-90 спричиняє транзйентне (2 – 2,5хв) зростання флуоресценції кальцій чутливого зонду fluo-4 у імобілізованих міоцитах матки.

Важливо, що у роботі наводяться дані, які підтверджують, що виявлені ефекти калікс[4]арена С-90 реалізуються і на фізіологічному рівні. Встановлено, що за дії 10мкМ калікс[4]арена С-90 на смужки міометрія знижуються амплітуда скорочення та швидкість розслаблення, що вказує на вірогідність його впливу на тонус матки.

Висновки роботи чітко сформульовані і логічно випливають з аналізу отриманих експериментальних даних. Викладені у дисертаційній роботі наукові положення та результати викладено у 8-х статтях (з яких 2 - у міжнародних наукових журналах) та апробовано автором на численних міжнародних наукових конференціях і з'їздах.

Разом з тим виникають деякі питання, відповіді на які сприятимуть глибшому розумінню отриманих автором даних.

1. У який спосіб розраховували величину $I_{0,5}$ для Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної активності? Виявлена різниця у величині цього показника для ензимів плазматичної мембрани та саркоплазматичного ретикулума може бути пояснена різною постановкою експеримента та різною створюваною локальною концентрацією калікс[4]арена С-90 (у разі inside-out везикул плазматичної мембрани інгібітор безпосередньо контактує з активним центром ензима, тоді як у разі необхідності проникнення до СР його концентрація розсіюється). Очевидно, можна говорити про селективність інгібіторної дії калікс[4]арена С-90 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТразу плазматичної мембрани порівняно з іншими АТРазами плазматичної мембрани, але не стосовно Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТрази СР.

2. Згідно кінетичного аналізу калікс[4]арен С-90 діє на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТразу ПМ як неконкурентний інгібітор у діапазоні концентрацій до 50мкМ. Це може бути причиною продемонстрованих у роботі підвищення концентрації цитозольного Ca^{2+} (за дії 20мкМ інгібітора) та змін у кінетиці м'язевого скорочення (за аплікації 10мкМ інгібітора). Однак, для доведення взаємодії з трансмембранними ділянками ензиму (мембранотропного механізму) та його пригнічувального ефекту на транспорт Ca^{2+} наводяться дані щодо спричинюваних 100мкМ калікс[4]ареном С-90 змін флуоресценції зонду АНС та зонду fluo-4, відповідно. Але за такої концентрації, як пише автор на с. 80, змінюється

кінетичний механізм дії інгібітора (знижуються K_{Ca} та p_H за Ca^{2+}) та виявляються його хелатні щодо іонів Ca, тобто неспецифічні, властивості. Чи нема тут протиріччя?

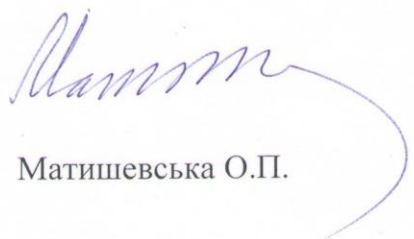
3. Для демонстрації проникнення калікс[4]арена C-90 через плазматичну мембрану у внутрішньоклітинний простір наводяться дані реєстрації (методом конфокальної мікроскопії) флуоресцентного сигналу каліксарена C-107 у міоцитах. Проте цей каліксарен значно відрізняється за структурою, не впливає на активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази ПМ і може відрізнитись за локалізацією від C-90. Можливо, варто провести експерименти з флюоресцентно міченим C-90.

4. Інгібіторний вплив калікс[4]арена C-90 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази активність має добре виражений дозозалежний характер. Чому відсутня концентраційна залежність пригнічувальної дії C-90 на величину швидкості розслаблення смужок міометрія?

Ці зауваження можуть бути враховані у перспективному плануванні подальших досліджень і не знижують високий науковий рівень представленої дисертації. У роботі отримано нові науково обгрунтовані дані, які у сукупності мають важливе фундаментальне значення для більш повного розкриття механізмів функціонування системи кальцієвого сигналіngu у клітинах міометрія і можуть бути корисними у практичному аспекті для розробки методів направленого впливу на скорочувальну активність міометрія.

Вважаю, що дисертаційна робота "Калікс[4]арен C-90 як селективний інгібітор Mg^{2+} , АТР-залежної кальцієвої помпи плазматичної мембрани клітин міометрія" відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника, затвердженого постановами Кабінету Міністрів України, а її автор Мазур Юлія Юріївна заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04-біохімія.

Офіційний опонент
доктор біологічних наук,
професор кафедри біохімії
ННЦ "Інститут біології"
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка


Матишевська О.П.

Підпис проф. Матишевської засвідчую
Заст. директора ННЦ "Інститут біології"
15 березня 2016 р.



